人卵母细胞前期染色体和核仁、微核仁的观察

刘瑞清　施立明　陈玉泽
（中国科学院昆明动物研究所）

关键词　人卵母细胞　减数分裂前期　染色体　核仁　微核仁

多年来，许多生物学家采用压片法（Ohno 等，1961，1962；Baker 1963），空气干燥法（Luciani 等，1974；Vebele-Kaelhardt，1978；Speed，1985））连续切片的电镜观察（Baker和Franchi，1967）等相继对人卵母细胞染色体进行过研究。Hartung等（1978）曾经以^{3}H—尿嘧啶核苷标记人卵母细胞前期核，观察了RNA的进行性变化。近年来，银染法的广泛运用，不仅揭示了动物，而且还揭示了人的卵母细胞前期核的 rDNA 转录活性和位置，并发现微核仁和拟核仁结构（Nucleolus-like structure）（Howell，1977 Wolgemuth 等，1977，1979；Schmiady 等，1979；Mirre，1980 Hartung 等，1983)。目前，由于细胞表面铺展制片技术，结合银染技术的使用，在光镜和电镜下能清楚观察人卵母细胞前期阶段的联会复合体（Synaptonemal complex）的结构和行为（Speed，1985）。这些研究，使我们对人卵母细胞早期减数分裂的复杂过程有了进一步了解。

我们采用空气干燥法制备标本，Giemsa染色和银染色技术，进一步详细观察人卵母细胞前期Ⅰ染色体的形态特征，以及核仁、微核仁和拟核仁的复杂变化过程。

材料和方法

约4—7个月龄的流产胎儿，将其卵巢摘下，放入生理盐水中，4°C冰箱保存。

（一）染色体标本制备。参照Luciani等(1974)方法。将卵巢剪碎，移入盛有0.4% KCl溶液的离心管中，室温低渗30分钟，离心（800—1000转/分钟）10分钟，甲醇：冰醋酸（3：1），固定20分钟，重复固定3次。然后加入45%冰醋酸处理4—5分钟，

本工作承蒙云南省第一人民医院妇产科实验室郭松莹大夫的热情支持，特此致谢。
本文1986年11月7日收到，1987年1月15日收到修改稿。

再加入45%冰醋酸体积的3倍甲醇，充分混匀，制备细胞悬液。空气干燥法制片。Giemsa染色。

（二）银染色技术参照Howell等（1980）方法。配制两种溶液：（1）2%白明胶溶液10毫升，加入0.1毫升甲酸。（2）50%硝酸银水溶液。

在染色体标本片上滴加（1）液2滴，（2）液4滴，盖上干净盖玻片，置于70°C温箱中2分钟左右，镜检，当染色体呈棕黄色，核仁呈黑色时，用蒸馏水冲洗，晾干。

结果和讨论

在3—7个月龄的胎儿卵巢中，卵原细胞逐渐转化成卵母细胞。这时，由于DNA的复制，RNA积极合成（Hartung等，1978），细胞体积增大，开始进入第一次减数分裂前期的前细胞期。近年来的工作表明，人卵母细胞前期染色体，从前细胞期发展到双线期，最终停止在核网期，需3—4个月左右时间。在这过程中，前期染色体经历了一系列DNA的螺旋化和解螺旋化的变化。因此，染色体的形态多种多样(Baker和Franchi, 1967; Luciani 等1974 Vebele-Kaelhardt, 1978; Speed, 1985）。休止在核网期的人卵母细胞，有称为“胚泡”（germinal vesicle）。将持续多年，直到性成熟和排卵。

现将我们观察的结果描述如下：

（一）前细线期（Preleptotene）**和细线期**（Leptotene）。

前细线期的染色体特征是高度螺旋化，凝聚收缩（图1. A）。凝聚成46个前染色体（Prochromosomes）。接着染色体开始解螺旋。图1. C表示解旋的细线期染色体。细长，紧密缠绕形成一个具有明显颗粒状的细线团。

在细线期，可观察到4—5个较大的主核仁（图1.B和D，短箭头），围绕着核仁周围约分布5—6个核仁组织者（NORs）。同时还观察到一些嗜银的大小不等的园点。因为具有核仁特性，被称为微核仁（Micronucleoli）（Hartung 等，1983）。微核仁的数目变化较大，约2—10个（图1.B和D，长箭头）。在核中，我们还看见许多更微小的嗜银点，分散在核中，似与染色体没有任何联系。

（二）偶线期（Zygotene）

在早偶线期，染色体再次开始螺旋化。同源染色体开始配对。配对染色体的末端，总是向着一定的方向缠绕（图2. A），形成花束状。因而这个阶段又称为花束期。在晚偶线期，配对的全过程或联会（Synapsis）结束。以后，同源染色体进一步结合在一起，凝聚收缩，逐步进入粗线期。

在偶线期，Hartung 等（1983）认为染色体的凝聚收缩，掩盖了核仁结构使之模糊不清，因此，研究这个时期的微核仁意义不大。但是我们在较早偶线期，仍然观察到一个嗜银的主核仁（图2. B，短箭头）、许多银染微核仁和小银点（图2. B，长箭头和弯箭头）。这个时期的主核仁，微核仁和嗜银小点，其数目都逐渐减少。

（三）粗线期（Pachytene）

在这个时期，两条同源染色体完全配对。形成双价体（bivalent）。由于双价体再次进一步螺旋化，使之变短而粗（图2.C和D）。在晚粗线期的一些双价体，同源染色

体之间开始相互排斥，开始分离，出现交叉（图2.C短箭头示分离，长箭头示交叉）。

在粗线期，主核仁和微核仁数目进一步减少。多数细胞出现1—2个主核仁（图2.D）。有的也出现3—4个。在这个时间，我们观察到银染核仁分成两个区域：一是强嗜银的，呈黑色的部分（图2.D，短箭头）。另一部分为弱嗜银性，呈棕黄或灰黄色，有的呈深棕色（图2.D，弯箭头）。这称为拟核仁（Nucleoli-like structure）（Hartung等，1983）。拟核仁在粗线期中，特别明显。到双线期时它们变小，分散在双价体中。在多数细胞中，拟核仁和微核仁都不同程度呈嗜银性，所以二者很难区分。粗线期中可见到核仁与双价体连接。与核仁连接的双价体数目较多，则核仁就大；与之连接的双价体数目少，核仁也就小。到粗线期微核仁数目开始趋于增加。

（四）双线期（Diplotene）

该时期的染色体，又再次广泛地解螺旋（图3.A）。同源染色体明显地相排斥，仅以交叉来保持它们的连系（图3.B和C，长箭头示交叉，短箭头示分离）。双线期之后，是核网期（Dictyotene）。此时的染色体高度地解螺旋化，非常纤细和伸长，其形态看来类似于"灯刷染色体"。

在晚粗线期与早双线期，主核仁逐渐消失或崩解，而微核仁数目逐步增多。在双线期，我们观察到大量的、体积较小的银染微核仁和许多分散在双价体中的银点。这时核仁的数目可多达20—50个。

综上所述，人卵母细胞前期核仁从前细线期到双线期，随着染色体的螺旋化和解螺旋化的改变，主核仁由多减少，直到双线期完全消失；而微核仁则由少增多，到双线期可达50多个。Hartung等（1983）认为，有些微核仁，早期可能来自多个核仁组织者（NOR_s）的聚合；在双线期可能是主核仁崩解的产物。原位分子杂交证明，人和动物卵细胞前期核中，银染微核仁和圆点是早期增殖的rDNA转录的结果（Wolgemuth等1977；Hubbell等，1980；Hartung 1978，1983）。在人卵母细胞中，额外rDNA的增殖，累积出现于整个减数分裂前期。从细线期到中粗线期，额外rDNA增殖可达2倍多（Wolgemuth等，1979）。我们在双线期观察到大量的微核仁（图3.A），其数目要比细线期的多几倍。这表明双线期rDNA的增殖量要大于前期核中其他任何阶段。早期的一些工作认为，银染微核仁仅出现于双线期（Hartug等，1979）。但我们在前细线期中也观察到嗜银性的微核仁。这说明，额外rDNA的表达较早，在前细线期就已开始。人卵母细胞的亚显微结构观察指出，银染阳性结构和rDNA的转录区域相一致（Mirre等，1980）。原位分子杂交已经证明，在卵母细胞和体细胞中，银染区域是18s+28s rDNA的活性位置（Hsu等，1975；Howell，1977）。银染的结构，不是rDNA本身，而是转录产物如一些酸性蛋白质（Howell，1977）。这些嗜银蛋白质主要是C_{23}和B_{23}蛋白质（Lischwe等，1979）。

OBSERVATIONS ON CHROMOSOMES AND NUCLEOLI, MICRONUCLEOLI OF MEIOTIC PROPHASE IN HUMAN OOCYTES

LIU Ruiqing SHI Liming CHEN Yuze

(Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica)

The chromosomes and nucleoli, micronucleoli in prophase of oocytes from human feotal were studied by Giemsa and silver-staining. There are profound changes of spiralization, despiralization, respiralization, redespiralization in the chromosomal morphology from preleptotene, diplotene, to dictyotone. The bivalents are uncoiled, extremely extended in dictyotene stage, and morphologically they are "lampbrush-like".

The morphology and number of primary nucleoli, micronucleoli as well as silver-stained small dots in various stages of prophase are also described.

Key words Human oocyte Meiotic prophase Chromosome Nucleolus Micronucleoli

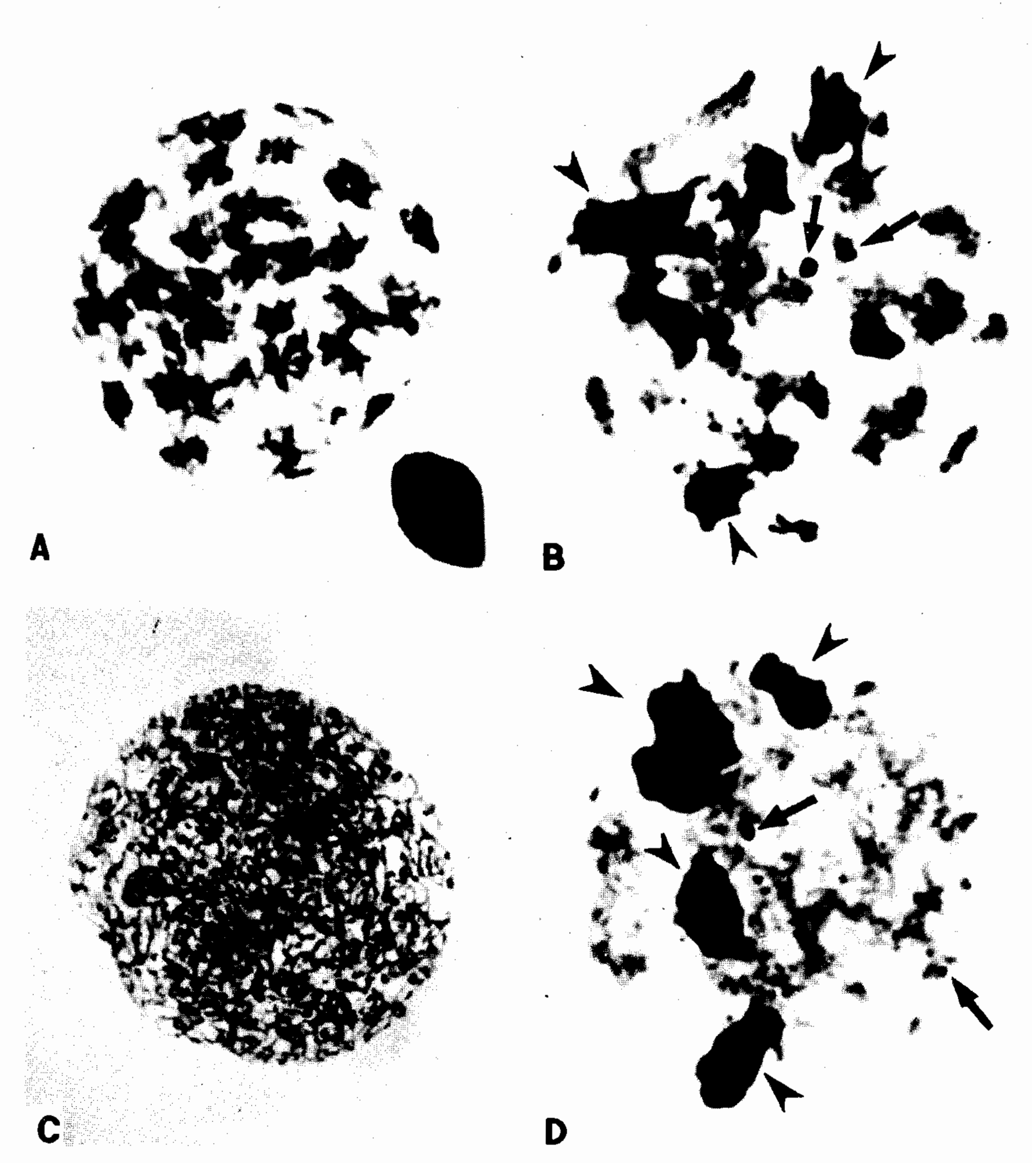


Fig. 1. prophase stages of meiosis in human feotal ovaries.(A).Giemsa stained preleptotene.(B). Silver-stained preleptotene. Arrow heads indicate primary nucleoli;arrows indicate micronucleoli and small dot. (C). Giemsa stained leptotene. (D). Silver-stained leptotene arrow-heads indicate primary nucleoli; arrows indicate micronucleoli and small dot.

图版 I

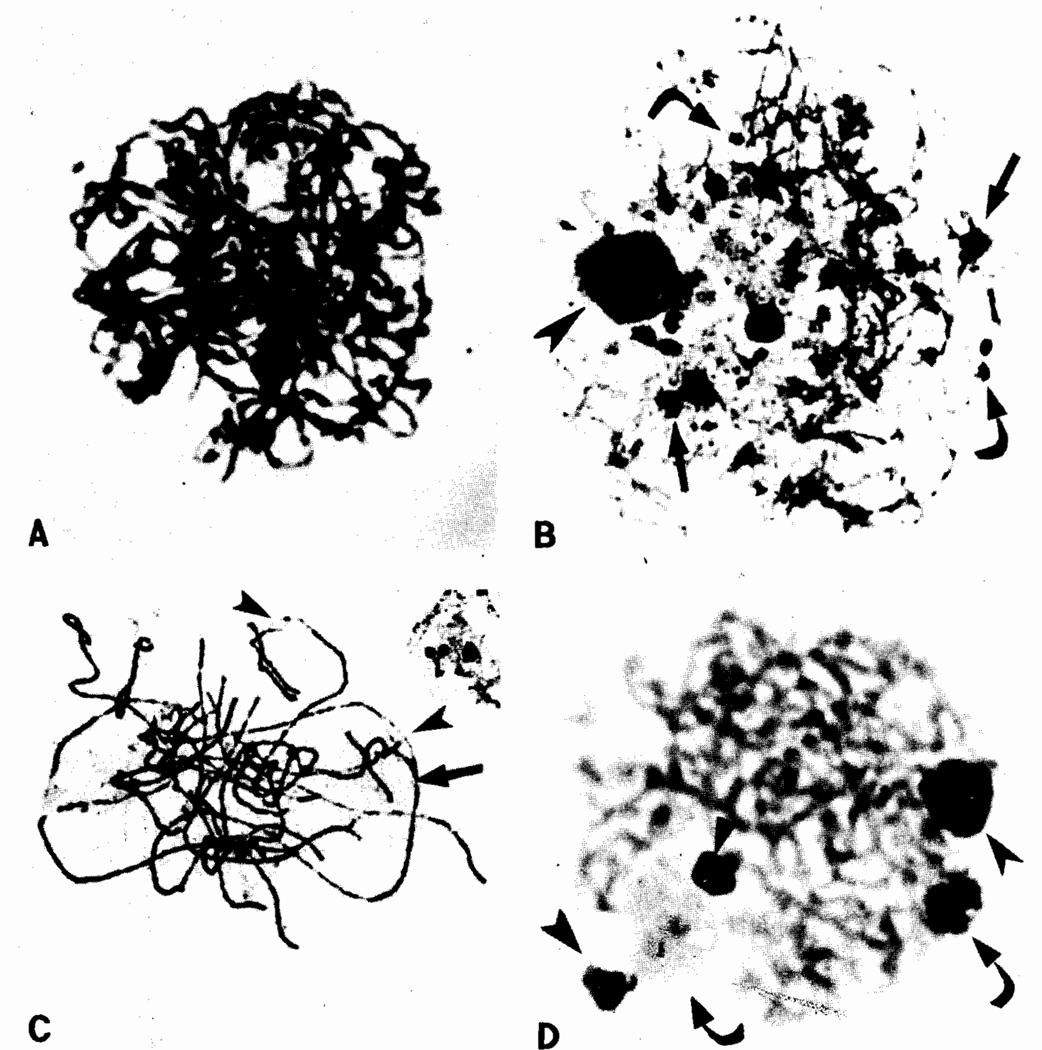


Fig.2. prophase stages of meiosis in human feotal ovaries. (A). Giemsa stained zygotene. (B). Silver-stained zygotene. Arrow-head indicates primary nucleolus;arrows indicate micronucleoli;curve arrows indicate dot. (C). Silver-stained pachytene. Arrow-heads indicate separation between homologues;arrow indicates chiasma. (D) Silver-stained pachytene. curve arrous indicate primary nucleolus-like structures.

图版 Ⅲ

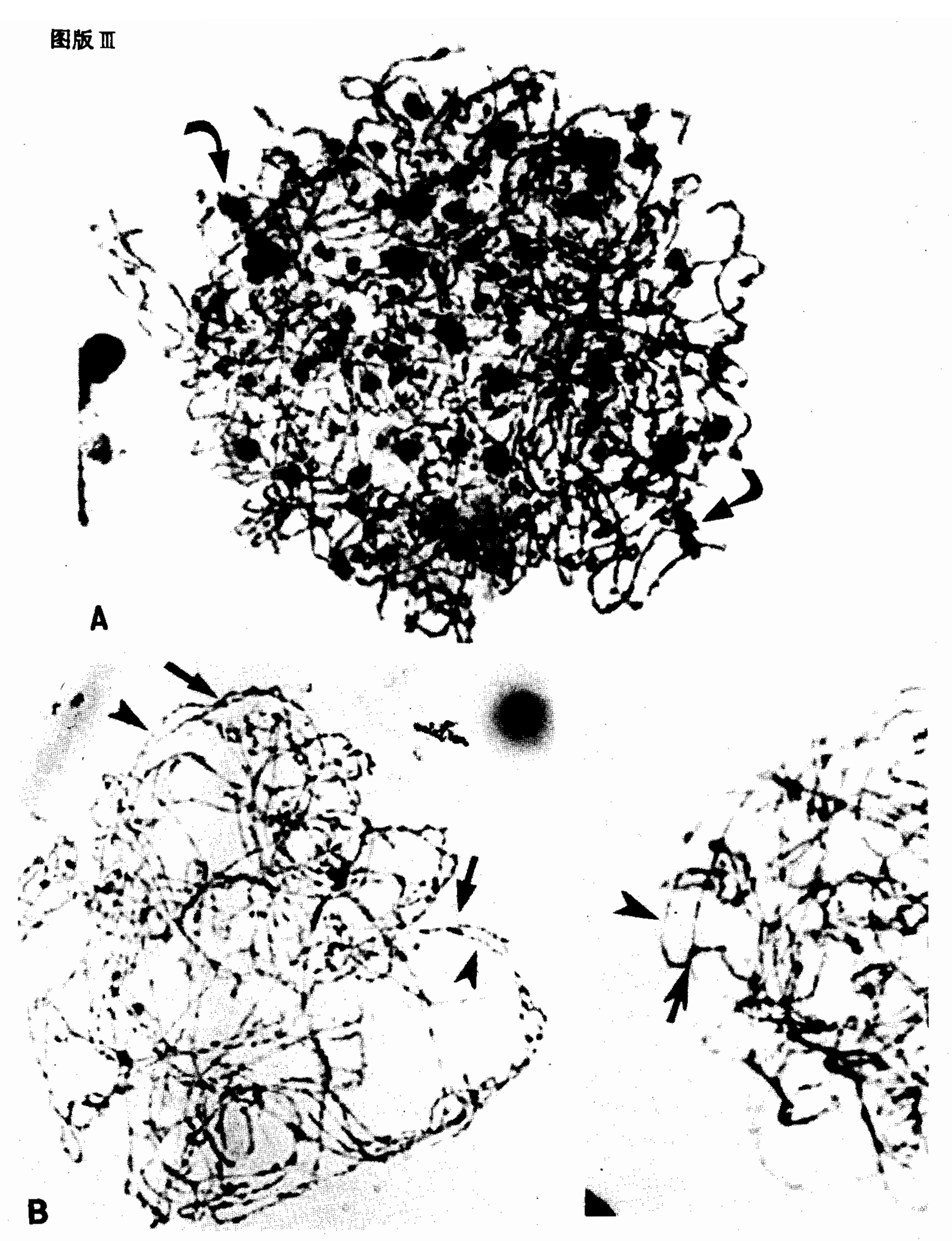


Fig.3. prophase stages of meiosis in human feotal ovaries. (A). Silver-stained diplotene showing micronucleoli between bivalents(curve arrows). (B) and (C) Giemsa stained diplotene. Arrow-heads indicate separation between homologues.arrows show chiasmata.